

МЕТОДИКА

проведения исследования клинического материала (мазки, соскобы, осадок мочи и др.)
на наличие ДНК возбудителей инфекций методом ПЦР
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

с использованием наборов реагентов:

ПОЛИМИК-Хл (*Chlamydia trachomatis*)
ПОЛИМИК-Мк (*Mycoplasma hominis*)
ПОЛИМИК-Ур (*Ureaplasma urealyticum*+*Ureaplasma parvum*)
УРЕАПОЛ-parvum (*Ureaplasma parvum*)
УРЕАПОЛ-urealyticum (*Ureaplasma urealyticum*)
ПОЛИМИК-Б (*Ureaplasma urealyticum*/*Ureaplasma parvum*)
ПОЛИМИК 2 (*Mycoplasma genitalium*)
ПОЛИМИК 1 (*Mycoplasma pneumonia*)
ГАРДПОЛ (*Gardnerella vaginalis*)
ГОНОПОЛ (*Neisseria gonorrhoeae*)
ТРИПОЛ (*Trichomonas vaginalis*)
ГЕРПОЛ (*Herpes simplex virus 2*)
ГЕРПОЛ 1+2 (*Herpes simplex virus 1+2*)
ЦИТОПОЛ (*Cytomegalovirus*)
ЛАКТОПОЛ (*Lactobacillus spp.*)
МОБИКУРТ (*Mobiluncus curtisii*)
БАКТОПОЛ (*Bacteroides spp.*)
ВИПАПОЛ комплекс (*Human papilloma virus*)
ВИПАПОЛ 16/18 (*Human papilloma virus 16,18*)
ВИПАПОЛ 31/33 (*Human papilloma virus 31,33*)
ВИПАПОЛ 6/11 (*Human papilloma virus 6,11*)
ЭБАРПОЛ (*Epstein Barr virus*)
ТЕТРАПОЛ (устойчивость к тетрациклинам)
ЭРИТРОПОЛ (устойчивость к эритромицину)
ПОЛИТУБ (*Mycobacterium tuberculosis*)
ТОКСОПОЛ (*Toxoplasma gondii*)
КАНДИПОЛ (*Candida albicans*)
АТОПОЛ (*Atopobium vaginae*)
КОЛИПОЛ (*Escherichia coli*)
ПРОТЕПОЛ (*Proteus spp.*)
АРУГИПОЛ (*Pseudomonas aeruginosa*)
ЭНКОПОЛ (*Enterococcus faecalis/faecium*)
ЭНТЕРОПОЛ (*Enterobacter spp.*)
СЕРАТИПОЛ (*Serratia spp.*)
СТАФИПОЛ (*Staphylococcus aureus*)
СТРЕПТОПОЛ (*Streptococcus spp.*)

СТРЕПТОПОЛ-А (*Streptococcus pyogenes*)
ПОЛИДИФ (*Corynebacterium diphtheriae*)
ПНЕВМОПОЛ-Хл (*Chlamydia pneumonia*)
ЛИСТЕРОПОЛ (*Listeria monocytogenes*)
ЭНТЕРОЦЕФ (резистентности *Enterobacteriaceae* к цефалоспоридам)
СТАФИЛОЦЕФ (Резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспоридам)

выделение ДНК из биопроб - комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС»

ПРИНЦИП РАБОТЫ МЕТОДА

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента ДНК микроорганизма путем накопления (амплификации) копий данного фрагмента (ДНК-мишени) в процессе синтеза новых цепей ДНК.

Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозид-трифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок - праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при 94°C происходит разделение цепей ДНК, затем при 57-62°C - присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени, и при температуре 72°C протекает синтез новых цепей ДНК путем удлинения праймера в направлении 5'-3'.

В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 35 циклов наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для его детекции с помощью электрофореза.

Проведение ПЦР-анализа включает 3 лабораторных этапа:

1. обработка клинических проб (выделение ДНК);
2. постановка реакции ПЦР (амплификация);
3. детекция продуктов амплификации (в данной методике - электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле).

ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ

Требования к помещениям и организации работ изложены в Методических указаниях МУ 1.3.1888-04 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности" (Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 04 марта 2004г).

Требования к проведению работ с патогенными микроорганизмами изложены в Санитарных правилах СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами" 1999г.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ и РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1 этап - выделение ДНК из биопроб:

- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8-12 тыс.об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин (или вортекс);
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;
- штатив для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- холодильник с морозильной камерой для хранения клинического материала;

- одноразовые перчатки;
- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС» (универсален для всех возбудителей, присутствующих в анализируемом материале).

2 этап - проведение ПЦР (амплификация):

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- программируемый термостат амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5 - 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- комплект реагентов для проведения ПЦР (индивидуален для каждого возбудителя);

3 этап - детекция продуктов амплификации:

- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-трансиллюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- технические весы для взвешивания агарозы;
- аквадистиллятор;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для нанесения образцов на гель;
- пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники до 200 мкл для нанесения образцов;
- одноразовые наконечники до 1000 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- агароза, раствор бромистого этидия, 50xTAE буфер для приготовления геля и проведения электрофореза (или готовый комплект реагентов для электрофоретической детекции);
- пластиковая емкость большого объема для дезактивации буфера и гелей;

СОСТАВ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ для ПЦР

В состав **набора** реагентов входят **три комплекта**:

1. Комплект для пробоподготовки (выделения ДНК)

Реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС» (на 100 анализируемых биопроб) (кат № 020103)

Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС» состоит из 100 пробирок типа Эппендорфф объемом 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 200 мкл реагента.

В качестве комплекта для пробоподготовки можно также использовать «Набор для выделения ДНК из биопроб»

2. Комплект для проведения ПЦР (амплификации)

Данные комплекты выпускаются в пяти различных форматах в зависимости от количества реакций и степени их готовности к постановке реакции.

(см. стр. 3)

3. Комплект для детекции продуктов амплификации

Для детекции продуктов амплификации можно использовать как готовые комплекты, так и отдельные реагенты.

Готовые комплекты:

Комплект №1 (кат №030106) (на 100 –150 образцов): агароза-2х2г, 50хТАЕ буфер-25 мл, раствор бромистого этидия-30мкл

Комплект №2 (кат №030107) (на 120 образцов): 2% агарозный гель (40 лунок) –3шт, 50хТАЕ буфер-25 мл

Отдельные реагенты:

- Агароза (100г/уп; 2г/уп) (кат №030101)
- Раствор бромистого этидия (1мл/уп) (кат №030104)
- 50хТАЕ буфер (200 мл/уп; 120мл/уп) (кат №030102)
- 2% агарозный гель для электрофореза (40 лунок)(1шт/уп; 5шт/уп)(кат №030108)

Описание форматов комплектов для проведение ПЦР

Формат, маркировка	Кол-во исследований	состав	Степень готовности к проведению реакции
НАИМЕНОВАНИЕ (50)	50 исследуемых образцов + 5 отрицательных контролей + 5 положительных контролей (всего 60 реакций)	1. Реакционная смесь—155 мкл; 2. Таq-полимераза—13 мкл; 3. Разбавитель—2 мл; 4. Минеральное масло—2 мл; 5. Положительный контрольный образец ДНК—25 мкл	Требуется предварительное смешение компонентов
НАИМЕНОВАНИЕ (100)	100 исследуемых образцов + 10 отрицательных контролей + 10 положительных контролей (всего 120 реакций)	1. Реакционная смесь—305 мкл; 2. Таq-полимераза—25 мкл; 3. Разбавитель—2 мл; 4. Минеральное масло—2 мл; 5. Положительный контрольный образец ДНК—55 мкл	
НАИМЕНОВАНИЕ (200)	200 исследуемых образцов + 20 отрицательных контролей + 20 положительных контролей (всего 240 реакций)	1. Реакционная смесь—600 мкл; 2. Таq-полимераза—50 мкл; 3. Разбавитель—4 мл; 4. Минеральное масло—4 мл; 5. Положительный контрольный образец ДНК—100 мкл	
НАИМЕНОВАНИЕ (50) P05, формат OneStep	49 исследуемых образцов** + 5 отрицательных контролей + 5 положительных контролей	1. Готовая смесь для амплификации под слоем масла— 54 пробирки объемом 0,5мл по 25 мкл; 2. Разбавитель—0,1мл; 3. Готовый к применению положительный контрольный образец ДНК—5 пробирок объемом 0,5мл по 30мкл;	Полностью готовые к применению смеси расфасованные в индивидуальные пробирки. Требуется только добавить анализируемую пробу. Положительный контрольный образец готов к постановке в амплификатор.
НАИМЕНОВАНИЕ (50) P02, формат OneStep	49 исследуемых образцов** + 5 отрицательных контролей + 5 положительных контролей	1. Готовая смесь для амплификации под слоем масла— 54 пробирки объемом 0,2мл по 25 мкл; 2. Разбавитель—0,1мл; 3. Готовый к применению положительный контрольный образец ДНК—5 пробирок объемом 0,2мл по 30мкл;	

** - комплекты для амплификации наборов ПОЛИМИК-Б и ГЕРПОЛ 1+2 формата OneStep рассчитаны на проведение анализа 44 исследуемых образцов 10 положительных контролей (по 5 контролей каждого типа) и 5 отрицательных контролей

Наименование набора	форматы				
	(50)	(100)	(200)	(50) P05	(50) P02
ПОЛИМИК-Хл (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИМИК-Мк (<i>Mycoplasma hominis</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИМИК-Ур (<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Ureaplasma parvum</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
УРЕАПОЛ-parvum (<i>ureaplasma parvum</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
УРЕАПОЛ-urealyticum (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИМИК-Б (<i>Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИМИК 2 (<i>Mycoplasma genitalium</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИМИК 1 (<i>Mycoplasma pneumonia</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ГАРДПОЛ (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ГОНОПОЛ (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ТРИПОЛ (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ГЕРПОЛ (<i>HSV2</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
ГЕРПОЛ 1+2 (<i>HSV1+2</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЦИТОПОЛ (<i>Cytomegalovirus</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЛАКТОПОЛ (<i>Lactobacillus spp.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
МОБИКУРТ (<i>Mobiluncus curtisii</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
БАКТОПОЛ (<i>Bacteroides spp.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ВИПАПОЛ комплекс (<i>HPV</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ВИПАПОЛ 16/18 (<i>HPV6,18</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ВИПАПОЛ 31/33 (<i>HPV31,33</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ВИПАПОЛ 6/11 (<i>HPV6,11</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЭБАРПОЛ (<i>Epstein Barr virus</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ТЕТРАПОЛ (уст-ть к тетрациклинам)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЭРИТРОПОЛ (уст-сть к эритромицину)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИТУБ (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ТОКСОПОЛ (<i>Toxoplasma gondii</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
КАНДИПОЛ (<i>Candida albicans</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
АТОПОЛ (<i>Atopobium vaginae</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
КОЛИПОЛ (<i>Escherichia coli</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПРОТЕПОЛ (<i>Proteus spp.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
АРУГИПОЛ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ЭНКОПОЛ (<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЭНТЕРОПОЛ (<i>Enterobacter spp.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
СЕРАТИПОЛ (<i>Serratia spp.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
СТАФИПОЛ (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
СТРЕПТОПОЛ (<i>Streptococcus spp.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
СТРЕПТОПОЛ-А (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПОЛИДИФ (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ПНЕВМОПОЛ-Хл (<i>Chlamydia pneumonia</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЛИСТЕРОПОЛ (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЭНТЕРОЦЕФ (резистентности <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспорином)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
СТАФИЛОЦЕФ (Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспорином)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. ВЫБОР АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Выбор клинического материала для исследования определяется наиболее вероятным местом локализации возбудителя. Наиболее адекватный материал для выявления возбудителей приведен в таблице на стр.6. Решение о выборе материала для исследования принимается врачом на основании совокупности жалоб пациента и клинических проявлений инфекции.

2. ВЗЯТИЕ, ДОСТАВКА и ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Взятие биологического материала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. Материал для исследования у женщин следует брать перед менструацией или через 1-2 дня после ее окончания. Женщины накануне обследования на ЗППП не должны проводить туалет наружных половых органов и спринцевание. Взятие биоматериала для контроля эффективности лечения должно проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

Количество материала, забираемого для исследования не должно быть избыточным, т.к. вместе с возбудителем в пробу попадают вещества, которые могут вызывать ингибирование ПЦР или могут способствовать деградации ДНК при хранении и транспортировке. При взятии мазков и соскобов достаточное количество материала - размером "со спичечную головку". Наиболее адекватным инструментом для взятия соскобов и мазков для ПЦР-анализа является специальный одноразовый урогентиальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую, почти не впитывает образец и хорошо отдает собранный материал в жидкую транспортную среду.

Возбудитель	Адекватный материал для выявления											
	соскоб эпителиальных клеток			мазки		Сперма, секрет простаты	моча	слюна	ликвор	Синовиальная жидкость	Смывы из бронхов, мокрота, БАЛ, плевральная жидкость	Лейкоцитарная масса крови
	цервикальный канал	уретра	конъюнктивы	влагалища	рогологка							
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<i>Mycoplasma hominis</i>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<i>Mycoplasma genitalium</i>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>	
<i>Gardnerella vaginalis</i>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>								
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<i>Trichomonas vaginalis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>						
<i>HSV 1,2</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
<i>Cytomegalovirus</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
<i>Lactobacillus spp.</i>				<input type="checkbox"/>								
<i>Mobiluncus curtisii</i>				<input type="checkbox"/>								
<i>Bacteroides spp.</i>				<input type="checkbox"/>							<input type="checkbox"/>	
<i>HPV</i>	<input type="checkbox"/>											
<i>Epstein Barr virus</i>							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>								<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Toxoplasma gondii</i>								<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
<i>Candida albicans</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	
<i>Atopobium vaginae</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>					
<i>Escherichia coli</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Proteus spp.</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Enterobacter spp.</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Serratia spp.</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Streptococcus spp.</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>					<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>					<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>
резистентность <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспорином	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспорином	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	

<i>материал</i>	<i>Взятие образца для анализа</i>	<i>Хранение, транспортировка</i>
мазки, соскобы	образцы помещаются <u>непосредственно в пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС»</u> .	неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК. Допускается хранение биопроб при +4...+8°C - не более 1 суток, при -18...-20°C - не более 2-х недель.
сперма, секрет простаты	Образцы собираются в одноразовую сухую стерильную пробирку.	
моча	собрать первую и среднюю порцию утренней мочи в количестве 20 мл в сухой стерильный флакон с плотно завинчивающейся крышкой	моча для исследования должна быть свежей (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>). До получения осадка исходный материал образец должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее.
слина, ликвор, синовиальная ж-ть	отобрать 1-1,5 мл исходного материала в сухую стерильную пробирку типа Эппендорфф вместимостью 1,5 мл;	материал для исследования должен быть свежим (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>)
смывы	Собрать в одноразовые плотно завинчивающиеся пробирки в количестве 50 мл	
мокрота, плевральная жидкость	собрать 10 мл в пластиковую центрифужную пробирку объемом 50 мл с плотно завинчивающейся крышкой	
лейкоцитарная масса крови	500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). <i>Гепарин использовать не рекомендуется.</i>	
		неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; <i>не замораживать!</i>

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА

- Образцы **мазков и соскобов** в пробирке с «ДНК-ЭКСПРЕСС» не требуют предварительной обработки.

- Образцы **спермы и секрета простаты**: 20-30 (максимум 50) мкл жидкого образца внести пипеткой в пробирку с 200 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС».

- Получение осадка **мочи**:

Весь объем первой и средней порции мочи тщательно взболтать и 10-15 мл отобрать в стерильную центрифужную пробирку. Центрифугировать 15-20 мин при 1,5-3000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.

Суспензию осадка (0,5-1 мл) перенести в одноразовую пробирку типа Эппендорфф (1,5мл), пробирку плотно закрыть и центрифугировать при 8 - 12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек.

Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

При необходимости (подозрение на охлаждение исходной мочи) можно однократно промыть осадок: добавить к осадку 200 -300 мкл физ.раствора, ресуспендировать на вортексе, отцентрифугировать и удалить надосадочную жидкость.

К осадку в пробирке добавить весь реагент (200 мкл) из одной пробирки из комплекта «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образцовую взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

- Образцы **смывов** обрабатывают для получения осадка также, как описано для мочи.

- Пробирки с образцами **слины, ликвора, синовиальной жидкости** отцентрифугировать в течение 10-15 минут при 12 000 об/мин, тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне около 50 мкл. К оставшейся в пробирке жидкой взвеси добавить весь реактив (200 мкл) из одной пробирки из комплекта «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием

и полученную суспензию перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой;

- К образцам **мокроты, плевральной жидкости** в центрифужной пробирке объемом 50 мл добавить равный объем реагента NALC, перемешать на вортексе в течение 5-20 секунд, инкубировать 15 минут при комнатной температуре, а затем развести 0.067М фосфатным буфером (рН 6.8) до 50 мл, центрифугировать 15 минут при 3000 об/мин, удалить надосадочный раствор. К осадку в пробирке добавить весь реагент (200 мкл) из одной пробирки из комплекта “ДНК-ЭКСПРЕСС” , тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

Реагент NALC (на 5 проб мокроты): 0.25 г ацетил-цистеина, 25 мл 4% NaOH, 25 мл 0.1М триНа цитрата (готовые исходные растворы на 100 образцов входят в состав “Комплекта для разжижения мокроты” кат № 030302). *Смесь готовят в день использования (раствор не хранится).*

- Пробирку с образцом **крови** с антикоагулянтом для получения лейкоцитарной массы аккуратно встряхнуть для перемешивания крови с антикоагулянтом, центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре. Плазму (верхняя фаза) отбрасывают с использованием индивидуального наконечника. Полученную клеточную массу крови (нижняя фаза) необходимо отмыть от эритроцитов. Методика отмывки: К 300 мкл осадка клеточной массы крови добавить 1 мл буфера (10мМ трис-HCl, 5мМ MgCl₂, 10мМ NaCl) и оставить на 20 мин при комнатной температуре до полного гемолиза эритроцитов. Отцентрифугировать 5 мин при 3000 об/мин. Процедуру повторить 2 раза. К осадку в пробирке добавить весь реагент (200 мкл) из одной пробирки из комплекта “ДНК-ЭКСПРЕСС” , тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

Хранение предварительно обработанных проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС»: при +4...+8°C - не более 1 суток, при -18...-20°C - не более 2-х недель.

Доставка проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

4.1. Пробирку с реактивом “ДНК-ЭКСПРЕСС”, содержащую анализируемый материал, тщательно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе (вортексе) в течение 10 секунд.

4.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до 98°C и прогреть при 98°C в течение 10 -15 минут. Примечание: *перед помещением пробирок в термостат необходимо проверить чтобы во всех пробирках был защелкнут замочек на крышках. Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру процесса не менее 98°C.*

4.3. После прогрева пробирки перенести в высокоскоростную микроцентрифугу и центрифугировать при 12000-16000g (8 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 20-30 сек.

4.4. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Обработанные таким образом пробы хранить при температуре +2-8°C в течение одной недели или при температуре -20°C в течение 6 мес.

5. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР (амплификация)

5.1. Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) в соответствии с количеством анализируемых проб на наличие ДНК выбранного возбудителя. Подготовить и промаркировать пробирки для положительного (маркировка «К+») и отрицательного (маркировка «К-») контрольных образцов. В комплектах для ПЦР для типирования микроорга-низмов в одной реакции (ГЕРПОЛ 1+2, ПОЛИМИК-Б, ВИПАПОЛ 16/18, ВИПАПОЛ 6/11) реакция стянвится с двумя положительными контрольными образцами.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для комплектов реагентов формата OneStep (готовая к применению расфасованная по индивидуальным пробиркам амплификационная смесь) маркируются пробирки с готовой смесью для анализируемых проб и пробирки для отрицательного

контрольного образца. Пробирки с положительным контрольным образцом полностью готовы к постановке в амплификатор. Проведение амплификации для наборов формата One Step начинается с п.5.7.

- 5.2.** За 20-30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР (амплификации) из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.
- 5.3.** Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:
Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций для достоверной дозировки объема фермента
17,5 мкл разбавителя,
2,5 мкл реакционной смеси,
0,2 мкл Taq-полимеразы
- При приготовлении рабочей амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.*
- 5.4.** После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.
- 5.5.** Добавить по 20 мкл рабочей амплификационной смеси во все пробирки, подготовленные для амплификации.
- 5.6.** Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.
- 5.7.** Внести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в соответствующую пробирку с рабочей амплификационной смесью под слой масла.
- 5.8.** Внести в пробирки для положительных контрольных образцов по 5 мкл соответствующего положительного контрольного образца ДНК, а в пробирку для отрицательного контрольного образца – 5 мкл разбавителя, используя индивидуальные наконечники с фильтрами.
- ПРИМЕЧАНИЕ: В комплектах реагентов серии One Step (готовая к применению расфасованная по индивидуальным пробиркам амплификационная смесь) положительный контрольный образец полностью готов к постановке в программируемый термостат (амплификатор)*
- 5.9.** Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1,5– 3000 об/мин при комнатной температуре (+18...+25°C) на микроцентрифуге-вортексе.
- 5.10.** Перенести пробирки в прогретый до температуры +93°C (или+94°C) (установившаяся температура в режиме Пауза) программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующим программам:

ПОЛИМИК-Хл (<i>C.trachomatis</i>)		
ПОЛИМИК-Мк (<i>M.hominis</i>)		
ПОЛИМИК-Ур (<i>Ureaplasma urealyticum</i>+<i>Ureaplasma parvum</i>)		
УРЕАПОЛ-parvum (<i>ureaplasma parvum</i>)		
УРЕАПОЛ-urealyticum (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)		
ГОНОПОЛ (<i>N.gonorrhoeae</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	35
60°	10 сек	
72°	10 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	
ГЕРПОЛ (<i>HSV II</i>) ГЕРПОЛ 1+2 (<i>HSV I+II</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94°	Pause	
94°	30 сек	1
94°	30 сек	5

64°	40 сек	
93°	10 сек	
62°	10 сек	30
72°	5 сек	
10°	Storage	

ПОЛИМИК 2 (*M.genitalium*) ПОЛИМИК 1 (*M. pneumoniae*)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	
57°	10 сек	40
72°	20 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	

ВИПАПОЛ 16/18 (HRV 16/18)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	
50°	10 сек	35
72°	10 сек	
10°	Storage	

ВИПАПОЛ компл (HRV); ВИПАПОЛ 31/33 (HRV 31/33)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	
55°	30 сек	35
72°	10 сек	
10°	Storage	

ТРИПОЛ (*T.vaginalis*)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	
62°	10 сек	40
72°	20 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	

ГАРДПОЛ (*G.vaginalis*)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	
57°	10 сек	25
72°	30 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	

ЦИТОПОЛ (*Cytomegalovirus*)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94°	Pause	
94°	30 сек	1
93°	10сек	
68°	20 сек	40
72°	20 сек	
10°	Storage	

ЛАКТОПОЛ (*Lactobacillus sp.*)

<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1

93°	10 сек	30
56°	10 сек	
72°	20 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	
БАКТОПОЛ (<i>Bacteroides spp.</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	35
60°	10 сек	
72°	10 сек	
72°	10 сек	1
10°	Storage	
МОБИКУРТ (<i>M. curtisii</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	35
59°	10 сек	
72°	20 сек	
10°	Storage	
ПОЛИМИК-Б (<i>Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	40 сек	1
93°	1 сек	35
62°	1 сек	
72°	20 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	
ЭБАРПОЛ (<i>Epstein-Barr virus</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94°	Pause	
94°	30 сек	1
94°	40 сек	3
64°	40 сек	
72°	40 сек	
92°	10 сек	32
62°	10 сек	
72°	10 сек	
10°	Storage	
ТЕТРАПОЛ		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	35
57°	10 сек	
68°	30 сек	
68°	1 мин	1
10°	Storage	
ЭРИТРОПОЛ		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93°	Pause	
93°	30 сек	1
93°	10 сек	35
54°	10 сек	
70°	20 сек	

70 °	1 мин	1
10 °	Storage	
ПОЛИТУБ (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93 °	Pause	
93 °	30 сек	35
59 °	30 сек	
72 °	30 сек	
10 °	Storage	
КАНДИПОЛ (<i>Candida albicans</i>), АТОПОЛ (<i>Atopobium vaginae</i>), ПОЛИДИФ (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>), ПНЕВМОПОЛ-Хл (<i>Chlamydia pneumonia</i>), ЛИСТЕРОПОЛ (<i>Listeria monocytogenes</i>), СТАФИЛОЦЕФ (Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспорином), ВИПАПОЛ 6/11 (HPV 6/11)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	1 мин 30 сек	1
94 °	10 сек	40
64 °	10 сек	
72 °	40 сек	
72 °	2 мин	1
10 °	Storage	
ТОКСОПОЛ (<i>Toxoplasma gondii</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	1 мин 30 сек	1
94 °	10 сек	40
64 °	10 сек	
72 °	10 сек	
72 °	2 мин	1
10 °	Storage	
КОЛИПОЛ (<i>Escherichia coli</i>), ПРОТЕПОЛ (<i>Proteus spp.</i>), АРУГИПОЛ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>), ЭНКОПОЛ (<i>Enterococcus faecalis, E.faecium</i>), ЭНТЕРОПОЛ (<i>Enterobacter spp.</i>), СЕРАТИПОЛ (<i>Serratia spp.</i>), СТАФИПОЛ (<i>Staphylococcus aureus</i>), СТРЕПТОПОЛ (<i>Streptococcus spp.</i>), СТРЕПТОПОЛ-А (<i>Streptococcus pyogenes</i>), ЭНТЕРОЦЕФ (резистентности <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспорином)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93 °	Pause	
93 °	30 сек	35
59 °	30 сек	
72 °	30 сек	
10 °	Storage	

6. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

6.1. Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз.

- 6.2. К 2,0 г агарозы добавить 2 мл 50х ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.
- 6.3. Приготовленную смесь расплавить на электрической плите или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать.
- 6.4. Охладить расплавленную агарозу до температуры 50-60°C и залить в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов установить на планшет гребенку, используя зажим типа «бульдог». После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.
- 6.5. Нанести в карманы геля по 10-15 мкл амплификата в последовательности соответствующей нумерации проб. Нанести положительные и отрицательные контроли.
- 6.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта 1,5-2см.
- Визуализация результатов электрофореза
- 6.7. Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.
- ВНИМАНИЕ!** *С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.*
- 6.8. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

7. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 7.1. В **отрицательном контрольном образце (К-)** для наборов с внутренним контролем должна выявляться одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК). Появление второй полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.
- Для наборов без внутреннего контроля полосы должны отсутствовать. Появление полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.
- Для наборов с внутренним контролем на человеческую ДНК полосы также должны отсутствовать. Появление полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора. Наличие полосы внутреннего контроля свидетельствует о контаминации человеческой ДНК и в этом случае перестановка не требуется.
- 7.2. В **положительном контрольном образце (К+)** для наборов с внутренним контролем должны выявляться две полосы:
- 1) полоса оранжево-красного цвета, соответствующая положительному контролю (ПК);
 - 2) полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК).
- Для наборов без внутреннего контроля должна выявляться одна полоса, соответствующая положительному контролю (ПК).
- Для наборов с внутренним контролем на человеческую ДНК также должна выявляться одна полоса, соответствующая положительному контролю (ПК). Наличие полосы внутреннего контроля свидетельствует о контаминации человеческой ДНК и в этом случае перестановка не требуется.
- 7.3. **Анализируемые пробы:**
- 1) отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контроля (ПК) свидетельствует об отсутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе;
 - 2) наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю – о присутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе.
- Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса внутреннего контроля ВК.
- Если в анализируемом образце для наборов с внутренним контролем отсутствует как полоса

положительного контроля, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР, неадекватная работа амплификатора, ошибка выполнения протокола проведения анализа). В этом случае необходимо провести повторный анализ, начиная со стадии выделения ДНК.

Примечание: Если в пробе присутствует большое количество ДНК искомого возбудителя, то на гель-электрофореграмме может не наблюдаться полосы внутреннего контроля. Это вполне допустимая ситуация и такие пробы следует интерпретировать как положительные.

Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

Набор	возбудитель	фрагмент ПК, п.н.	фрагмент ВК, п.н.
ПОЛИМИК-Хл	<i>Chlamydia trachomatis</i>	273	615
ПОЛИМИК-Мк	<i>Mycoplasma hominis</i>	956	500
ПОЛИМИК-Ур*	<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Ureaplasma parvum</i>	408	238
УРЕАПОЛ-parvum*	<i>Ureaplasma parvum</i>	666	238
УРЕАПОЛ-urealyticum*	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	652	238
ПОЛИМИК-Б	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>Ureaplasma parvum</i>	Parvo: 850 T960: 223	отсутствует
ПОЛИМИК 2	<i>Mycoplasma genitalium</i>	525	822
ПОЛИМИК 1	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	697	отсутствует
ГАРДПОЛ	<i>Gardnerella vaginalis</i>	317	129
ГОНОПОЛ	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	270	412
ТРИПОЛ	<i>Trichomonas vaginalis</i>	640	390
ГЕРПОЛ	<i>Herpes simplex virus 2</i>	227	385
ГЕРПОЛ 1+2	<i>Herpes simplex virus 1+2</i>	HSV1: 179 HSV2: 270	530
ЦИТОПОЛ	<i>Cytomegalovirus</i>	388	781
ЭБАРПОЛ	<i>Epstein-Barr virus</i>	378	550
ЛАКТОПОЛ	<i>Lactobacillus spp.</i>	373	260
МОБИКУРТ	<i>Mobiluncus curtisii</i>	397	450
БАКТОПОЛ	<i>Bacteroides spp.</i>	434	600
ВИПАПОЛ компл*	<i>Human papilloma virus</i>	420	220
ВИПАПОЛ 16/18	<i>HPV 16,18</i>	HPV16: 270 HPV18: 360	450
ВИПАПОЛ 31/33	<i>HPV 31,33</i>	410	700
ВИПАПОЛ 6/11*	<i>HPV 6,11</i>	HPV6: 470 HPV11: 600	220
ТЕТРАПОЛ	уст-ть к тетрациклинам	407	отсутствует
ЭРИТРОПОЛ	уст-ть к эритромицину	282	отсутствует
ПОЛИТУБ*	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	218	507
ТОКСОПОЛ *	<i>Toxoplasma gondii</i>	347	220
КАНДИПОЛ *	<i>Candida albicans</i>	535	220
АТОПОЛ *	<i>Atopobium vaginae</i>	600	220
КОЛИПОЛ *	<i>Escherichia coli</i>	405	220
ПРОТЕПОЛ *	<i>Proteus spp.</i>	798	220
АРУГИПОЛ *	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	309	220
ЭНКОПОЛ *	<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	402	220
ЭНТЕРОПОЛ *	<i>Enterobacter spp.</i>	313	220
СЕРАТИПОЛ *	<i>Serratia spp.</i>	778	220
СТАФИПОЛ *	<i>Staphylococcus aureus</i>	311	220
СТРЕПТОПОЛ *	<i>Streptococcus spp.</i>	315	220

ПОЛИДИФ*	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	147	240
ПНЕВМОПОЛ-ХЛ*	<i>Chlamydia pneumonia</i>	269	966
СТРЕПТОПОЛ-А*	<i>Streptococcus pyogenes</i>	420	966
ЛИСТЕРОПОЛ*	<i>Listeria monocytogenes</i>	118	240
ЭНТЕРОЦЕФ*	<i>Enterobacteriaceae</i>	495	220
СТАФИЛОЦЕФ*	<i>Staphylococcus aureus</i>	861	220

* - наборы с внутренним контролем на человеческую ДНК

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Для комплектов с внутренним контролем

Контрольные образцы

Полосы фрагментов ДНК	K+	K-	K+	K-
ПК	+	--	--	+
ВК	+	+	--	+
Интерпретация	Амплификация прошла, методика анализа соблюдена		Амплификация не прошла (в пробе присутствуют ингибиторы или нарушена методика проведения анализа)	
				Контаминация (загрязнение) компонентов набора

Анализируемые пробы

Полосы фрагментов ДНК	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
ПК	+	--	+	--
ВК	+	+	--	--
Интерпретация	Присутствие ДНК искомого возбудителя	Отсутствие ДНК искомого возбудителя	Присутствие ДНК искомого возбудителя	Амплификация не прошла (в пробе присутствуют ингибиторы или нарушена методика проведения анализа)

8.2 Для комплектов с внутренним контролем на человеческую ДНК

Контрольные образцы

Полосы фрагментов ДНК	K+	K-	K-	K+	K-
ПК	+	--	--	--	+
ВК	--	--	+	--	+
Интерпретация	Амплификация прошла, методика анализа соблюдена		Контаминация человеческой ДНК, перестановка не требуется	Амплификация не прошла	Контаминация (загрязнение) ДНК возбудителя. Необходима перестановка

Анализируемые пробы

Полосы фрагментов ДНК	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
ПК	+	--	+	--
ВК	+	+	--	--
Интерпретация	Присутствие	Отсутствие	Присутствие	Амплификация

	ДНК искомого возбудителя	ДНК искомого возбудителя	ДНК искомого возбудителя	не прошла (в пробе присутствуют ингибиторы, либо нарушена методика проведения анализа)
--	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	---

9. ДЕЙСТВИЯ В СЛУЧАЕ ИНГИБИРОВАНИЯ РЕАКЦИИ ПЦР

- 9.1.** При отсутствии в анализируемых образцах как полосы ВК, так и полосы ПК (ингибирование реакции) необходимо провести повторный анализ пробы, начиная со стадии выделения ДНК.
- 9.2.** 100 мкл раствора выделенной согласно п.4. ДНК перенести в новую пробирку с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС» и провести всю процедуру выделения (п.п. 4.1. - 4.4) , постановки ПЦР (п.п. 5.1. - 5.10) и анализа результатов (п.п. 6.1. - 6.8) заново.
- 9.3.** Если процедура повторной обработки и анализа пробы, не приводит к появлению полосы ВК или ПК, рекомендуется повторное взятие биоматериала у пациента.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ и ТРАНСПОРТИРОВКИ РЕАГЕНТОВ

- 10.1.** Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС» должен храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при комнатной температуре не более 5 суток.
- 10.2.** Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре минус 18-25°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при температуре не выше 0°C не более 2,5 суток.
- 10.3.** Комплект для электрофоретической детекции №1, агароза, 50xTAE-буфер и раствор бромистого этидия может храниться при комнатной температуре в течение всего срока годности (указан на этикетке).
- 10.4.** Комплект для электрофоретической детекции №2 и готовые агарозные гели должны храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства).

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение методики проведения исследования.

**По вопросам, касающимся качества наборов реагентов, следует обращаться в НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1, стр.3
телефон/факс: (495) 589-14-03; e-mail: info@lytech.ru**

ПРИЛОЖЕНИЕ

Выделение ДНК из биопроб с использованием комплекта
«Набор для выделения ДНК из биопроб» (кат № 020101)

Состав комплекта: (на 100 образцов): *Хранить при +2...+8°C*

- | | |
|------------------------------------|----------|
| 1. Раствор I (лизирующий) | 30 мл |
| 2. Раствор II (промывочный) | 10 мл |
| 3. Раствор III (промывочный) | 200 мл |
| 4. Сорбент | 1000 мкл |
| 5. ТЕ буфер | 5 мл |

1. Подготовка образца

Анализируемый материал (соскобы, мазки, 20-30 мкл спермы или сока простаты, осадок мочи или др. взвесей, полученные согласно п.3) поместить в 100 мкл физиологического раствора, находящегося в полипропиленовой пробирке объемом 1.5 мл типа Эппендорфф, перемешать, пробирку плотно закрыть.

Приготовленные таким образом пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК или хранить при температуре +4...+8°C не более 1 суток, при -18... - 20°C не более 2 недель. Доставка проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

2. Выделение ДНК

2.1. В пробирку содержащую образец в физиологическом растворе (см.п.1) , добавить 300 мкл раствора I и 10 мкл суспензии сорбента.

Внимание! Суспензию сорбента перед использованием необходимо тщательно перемешать до полной гомогенности.

2.2. Пробирки плотно закрыть и инкубировать в течение 10 минут при комнатной температуре, 1-2 раза перемешивая на вортексе.

2.3. Центрифугировать в течение 15 сек на микроцентрифуге-вортексе при 8-12 тыс.об/мин., супернатант отбросить с использованием вакуумного аспиратора в колбу-ловушку с дез.раствором.

2.4. К осадку добавить 100 мкл раствора II, плотно закрыть пробирку и перемешать на вортексе.

2.5. Сорбент осадить центрифугированием при 8-12 тыс.об/мин. в течение 15 сек. Супернатант отбросить.

2.6. Процедуру отмывки (добавление раствора, встряхивание на вортексе и осаждение центрифугированием) повторить еще два раза с использованием 1.0 мл раствора III для промывки.

2.7. Дополнительным центрифугированием при 8-12 тыс.об/мин., с последующим отбрасыванием супернатанта убрать остатки раствора III.

2.8. Пробирки поместить в твердотельный термостат и подсушить пробы 5 мин при температуре 45-55°C, оставляя пробирки открытыми.

Внимание! На всех стадиях обработки клинического материала удаление супернатанта производят одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи вакуумного аспиратора в колбу-ловушку, содержащую дезинфицирующий раствор (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т.п.)

2.9. В пробирки с сорбентом добавить 50 мкл ТЕ буфера, пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 минут при 45-55°C в твердотельном термостате.

2.10. Пробирки центрифугировать 15 сек при 8-12 тыс.об/мин, водную фазу (супернатант) использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

Раствор ДНК (супернатант, перенесенный с осадка сорбента в чистую пробирку), можно хранить при температуре +4...+8°C в течение недели или при температуре -20°C в течение 6 месяцев.

Для применения данной методики необходимо следующее оборудование в дополнение к перечисленному на стр.1-2: Вакуумный аспиратор (насос) с колбой-ловушкой; пипетки-дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 200-1000мкл);